

Title	Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ Inhibit Synergistically Viral Replication in Hepatitis B Virus-Replicating Cells.
Author(s)	川西, 裕子
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39570
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	川 西 裕 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 2 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 2 月 7 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Tumor Necrosis Factor - α and Interferon - γ Inhibit Synergistically Viral Replication in Hepatitis B Virus - Replicating Cells. (B型肝炎ウイルス産生細胞における tumor necrosis factor - α と interferon - γ の協同的なウイルス抑制作用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鎌 田 武 信 (副査) 教 授 松 沢 佑 次 教 授 山 西 弘 一

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

B型肝炎ウイルス (HBV) による慢性肝炎は、肝硬変や肝癌の原因となることが知られている。現在interferon (IFN) - α , IFN - β がHBe抗原の陰性化に有効な治療薬として用いられているが、その有効率には限界があり、また、その作用機構も十分解明されていない。一方、近年の研究により、IFN - γ や tumor necrosis factor - α (TNF - α) などのサイトカインがHBVの排除に関わっている可能性のあることが示唆されている。そこで今回、TNF - α および IFN - γ が、HBV に対し直接的な抗ウイルス作用を有するかどうかを明らかにするために検討を行なった。

【方 法】

培養細胞株HB611を用いた。これは、HBVゲノムの全長を head - to - tail に3個 tandem に連結し、ネオマイシン耐性遺伝子を付加したプラスミドを、ヒト hepatoblastoma 由来の細胞株 Huh6 に導入したもので、このプラスミドはヒトゲノムに integration され、安定にHBVを発現し続ける。すなわち、組み込まれたDNAから pregenome RNA が転写され、次に逆転写の過程を経て複製中間体DNAが合成され、細胞内に蓄積する。また細胞外にはHBs抗原、HBe抗原、およびDane粒子が放出される。このHB611を60mm径の culture dish に 1×10^5 個 seed し、2日後より TNF - α または IFN - γ 、あるいはその両者を培養液中に添加し、3日ごとに同濃度のサイトカインを添加した新しい培養液に交換しながら、計14日間培養した。培養終了時トリパンブルー染色にて細胞の viability を検討したところ、常に90%以上であった。培養細胞より total DNA を抽出し、HBVゲノムの中に切断部位を持たない制限酵素 HindIII で処理した後、 ^{32}P でラベルした HBV DNA をプローブに用いてサザン・ブロットによる解析を行った。同時に、イメージアナライザーシステム BAS 2000 を用いて各バンドの放射活性の定量的評価を行なった。また、培養細胞より AGPC 法 (acid guanidinium - phenol - chloroform method) にて total RNA を抽出し、 ^{32}P でラベルした HBV DNA をプローブとしてノザン・ブロットによる解析を行なった。さらに、デハイブリダイゼーションの後、 β アクチンのDNAをプローブとしてリハイブリダイゼーションを行なった。培養終了時の培養上清を回収し、上清中のHBe抗原、AFP、および2', 5' - oligoadenylate synthetase (2 - 5AS) 活性を測定した。

【成 績】

HB611細胞から抽出したDNAの解析の結果、TNF- α 、IFN- γ 、またはその両者の添加により、integrationされたHBV DNAは変化を受けなかったが、HBVの複製中間DNAであるS、D₁、D₂は減少し、ウイルスの複製が抑制されていると考えられた。この抑制作用はTNF- α 、IFN- γ ともそれぞれdose-dependentであり、両者を同時添加するとさらに強い抑制効果が示された。S、D₁、D₂の減少率はそれぞれほぼ同じであった。また、HB611から抽出したRNAの解析の結果、HBV由来の3.5kbのRNA (pregenome RNAを含む)と2.4および2.1kbのRNAがバンドとして検出されたが、TNF- α およびIFN- γ の添加によりこれらのRNAの量には明らかな変化を認めなかった。コントロールとして用いた β アクチンのmRNAにも変化はみられなかった。培養上清中へのHBe抗原およびAFPの産生はTNF- α およびIFN- γ により影響を受けなかった。2-5AS活性はすべてのサンプルで検出感度以下であった。

【総 括】

TNF- α およびIFN- γ が、培養細胞を用いた系でHBVに対し直接的な抗ウイルス作用を有することが示された。また、TNF- α およびIFN- γ の添加によりpregenome RNAを含めHBV RNAに変化がみられず、ウイルスのmRNAから作られるHBe抗原タンパク量にも変化がみられないこと、これに対してHBVの複製中間体DNA (S、D₁、D₂)がいずれもほぼ同率に減少していること、添加したサイトカインによる明らかな細胞障害はみられないことから、TNF- α とIFN- γ のHBVに対する作用機序は、いずれも主として逆転写の段階を抑制しているものと考えられた。また、今回得られた結果より、TNF- α およびIFN- γ がIFN- α と同様にB型肝炎患者の肝においてHBVの排除に役割を果たしている可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

慢性B型肝炎における肝炎ウイルスの排除機構としては、従来、IFN- α 、IFN- β によるウイルス増殖の抑制と、細胞障害性T細胞によるHBV感染肝細胞の排除が知られている。一方近年、TNF- α 、IFN- γ が、細胞障害性T細胞の作用を介さずに、HBVの増殖を抑制することが注目されている。そこで本研究では、培養細胞の系を用いて、TNF- α 、IFN- γ が免疫担当細胞を介さずにdirectにHBV増殖を抑制するかどうかについて検討を行った。その結果、TNF- α とIFN- γ は直接HBVの増殖を抑制し、さらに、両者の併用により作用が増強されることが示された。また、その作用機序は逆転写段階の阻害であると考えられた。

本研究は、TNF- α とIFN- γ の直接的なウイルス増殖抑制作用を明らかにし、B型肝炎の病態解明および治療の研究に貢献するものであり、学位に値するものと認める。